

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **03160935 A**

(43) Date of publication of application: **10 . 07 . 91**

(51) Int. Cl

A01H 4/00

(21) Application number: **01300771**

(22) Date of filing: **21 . 11 . 89**

(71) Applicant: **AJINOMOTO CO INC**

(72) Inventor: **OOSUMI CHIEKO
HAYASHI TAKAHISA
KIDA TAKAO**

(54) **PREPARATION OF PLANT BODY**

(57) Abstract:

PURPOSE: To form a number of well-grown stalks and leaves and to prepare a plant body in high efficiency by inducing a multi-bud material or stalk and leaf from a tissue of a plant of genus *Allium* and culturing the multi-bud material, etc., in a medium containing indolebutyric acid and benzyladenine.

CONSTITUTION: A multi-bud material or stalk and leaf induced from the tissue of a plant of genus *Allium* is cultured in a medium containing indolebutyric acid and

benzyladenine to prepare a plant body of genus *Allium* having extremely improved growth of the stalk and leaf. Even a plant cultured in the above medium to grow the stalk and leaf, a high rooting rate can be attained by culturing in a medium containing abscisic acid. The plant tissue for inducing the multi-bud material or the stalk and leaf may be leaf or root for the purpose of clone proliferation, however, it is preferably the apex of scale or common leaf. The use of shoot apex having little contamination with virus is preferable for the purpose of the preparation of virus-free stock.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-160935

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)7月10日

A 01 H 4/00

8602-2B

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全4頁)

⑮ 発明の名称 植物体の作出方法

⑯ 特 願 平1-300771

⑰ 出 願 平1(1989)11月21日

⑱ 発 明 者 大 住 千 栄 子 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

⑲ 発 明 者 林 隆 久 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

⑳ 発 明 者 木 田 隆 夫 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

㉑ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

㉒ 代 理 人 弁理士 田中 政浩 外1名

明 細 書

1 発明の名称

植物体の作出方法

2 特許請求の範囲

(1)アリウム属の植物組織より誘導した多芽体又は莖葉をインドール酪酸及びベンジルアデニンを含む培地にて培養することを特徴とするアリウム属植物体の作出方法

(2)アリウム属の植物組織より誘導した多芽体又は莖葉をアブシジン酸を含む培地にて培養することを特徴とするアリウム属植物体の作出方法

(3)アリウム属の植物組織より誘導した多芽体又は莖葉をインドール酪酸及びベンジルアデニンを含む培地で培養して莖葉を生長せしめ、次いでアブシジン酸を含む培地で培養して発根せしめることを特徴とするアリウム属植物体の作出方法

(4)多芽体又は莖葉を誘導する植物組織がりん片内の莖頂である請求項1、2又は3に記載の作出方法

(5)多芽体又は莖葉を誘導する植物組織がりん片内

の普通葉である請求項1、2又は3に記載の作出方法

(6)多芽体又は莖葉が継代培養を繰返されたものである請求項1、2又は3に記載の作出方法

(7)多芽体又は莖葉がカルスを經由して分化したものである請求項1、2又は3に記載の作出方法

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は例えば、ニンニク (*Allium sativum*) の植物組織からのクローン増殖およびウィルスフリー株作出の方法に関するものである。

ニンニクは、アリウム属の植物であるが、香辛料としての食材として重要な作物の1つである。ニンニクは、一般的には栄養繁殖であり種子ができない。このため栄養体であるりん片へのウィルスの侵入が避けられず収量の減少などが起こる。それを防ぐ手段として、ウィルスに犯されていない莖頂(成長点)を無菌的に切り出し、増殖させることによってウィルスフリー株を作出できる。またこれらを種子として増やすことはできないの

でウィルスフリー株の増殖や優良株の増殖には、カルスあるいは茎葉あるいは、多芽体を用いたクローン増殖が行なわれている。

〔従来の技術〕

クローン増殖およびウィルスフリー株の作出には、りん片内の普通葉、あるいは茎頂を無菌的に切り出し、オーキシンやサイトカイニンを含む培地で茎葉あるいは多芽体を形成させ、この茎葉を1本ずつに分離し、発根培地としてオーキシンのみ、あるいはオーキシンとサイトカイニンあるいはホルモン無添加の培地に移植し培養して発根させている。ここで生産性を向上させるためには、いかに多くの生育のよい茎葉を形成できるか、という点と、高い発根率が重要である。

〔発明が解決しようとする課題〕

しかし、従来の方法では、小さな茎葉のみしか形成されず、しかもその発根率は高いものではなかった。また、茎葉の数を増加させるのにサイトカイニンの添加量の効果は知られているがこれにより次のステップの発根はいちじるしく低下する。

従って、本発明の課題は生育のよい茎葉を数多く形成させ、また、高い頻度で発根させ効率よくニンニク等のアリウム属植物のクローン増殖およびウィルスフリー株を作出することである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者らは上記目的を達成するべく鋭意検討の結果、アリウム属の植物組織より誘導した多芽体又は茎葉をインドール酢酸及びベンジルアデニンを含む培地で培養すると茎葉の生育が著しく良化されること及び前記培地で培養して茎葉を生育させたものであってもアブジジン酸を含む培地で培養することにより良好な発根率で発根させることができることを見出してこの知見に基いて本発明を完成するに至った。

本発明の作出方法で作出される植物はアリウム属の植物である。アリウム属の植物であれば特に制限されないが、例えばニンニク (*Allium sativum*)、ニラ (*Allium chinense*)、タマネギ (*Allium cepa*) 等である。これらのなかでニンニクが特に好ましい。上記植物にはそれぞれ各種の品種、

- 3 -

栽培種等があるがその種類を問わない。多芽体又は茎葉を誘導する植物の組織はクローン増殖を目的とする場合には葉、根でも良いがりん片内茎頂、あるいは普通葉が望ましく、ウィルスフリー株作出を目的とする場合にはウィルスの少ない茎頂が望ましい。

本発明において使用する茎葉および多芽体の誘導には、無機塩類、炭素源及び他の栄養成分を含む培地が用いられる。無機塩類としては、通常の植物組成培養で使用される基本培地、例えば、ムラシゲとスコーグ (Murashige & Skoog) の培地、リンズマイヤーとスコーグ (Linsmaier & Skoog) の培地、ホワイト (White) の培地、ガンボーク (Gamborg) の培地、ヘラー (Heller) の培地等、あるいは、上記等の培地の無機イオン濃度を適当量に改変した培地等が用いられる。炭素源としては、シュクロース、グルコース、フラクトース等が5~100g/lで使用される。

上記の培地にさらにイノシトール1~1000mg/l、ニコチン酸0.01~5mg/l、チアミン塩酸塩0.01~

- 4 -

1mg/l、ピリドキサル塩酸0.01~1mg/lおよびグリシン0.01~10mg/lを添加すれば、より良好な増殖が得られる。

上記の培地に更にオーキシン類、望ましくはサイトカイニン類を添加した培地を用いると良好な結果が得られる。オーキシン類の例としては、インドール酢酸、ナフトリル酢酸、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸等を挙げることができ、サイトカイニン類には、ゼアチン、ベンジルアデニン、カイネチン等がある。これらの成長調節物質は、通常の組織培養で用いる量の範囲であれば良い。上述のように調整した培地はpH4.0~8.0に調整し、寒天等を0.2%~2%加え常法通り殺菌して固体培地として用いられる。前記の植物組織を上記の如き培地に置床し、20~30℃程度、通常は室温で培養することによって多芽体あるいは茎葉を形成させることができる。茎葉および多芽体はオーキシン、サイトカイニン添加培地にて増殖を繰返したものでよく、さらにカルスより分化したものでよい。

- 5 -

- 6 -

植物組織より誘導した莖葉および多芽体は、前記と同様の無機塩類、炭素源及び他の栄養成分を含有する培地にインドール酪酸及びベンジルアデニンをさらに添加した培地で培養する。インドール酪酸の濃度としては0.5~5 mg/l程度が適当であり、1~3 mg/l程度が好ましい。ベンジルアデニンの濃度は0.1~2 mg/l程度が適当であり、0.5~1 mg/l程度が好ましい。この培地もやはりpH4.0~8.0に調整し、寒天等を0.2~2%を加えて常法通り殺菌して固体培地として用いる。培養条件としては20~30℃程度、通常は室温で1~24時間/日、好ましくは10~20時間/日の光照射下で1~4週間程度培養することによって生育のよい莖葉をうることができる。

さらに、莖葉および多芽体を発根せしめるためには、植物成長調節物質としてアブシジン酸を添加した培地を用いることが望ましい。このとき、他の植物成長調節物質は添加しなくともよい。アブシジン酸の濃度としては0.01~1 mg/l程度が適当であり、0.05~0.5 mg/l程度が好ましい。アブ

シジン酸を添加する培地も前記と同様の無機塩類、炭素源及び他の栄養成分を含有する培地でよい。この培地もやはりpH4.0~8.0に調整し、寒天等を0.2~2%を加えて常法通り殺菌して固体培地として用いる。培養条件としては20~30℃程度、通常は室温で1~24時間/日、好ましくは10~20時間/日の光照射下で1~4週間程度培養することによって充分に発根した幼植物体をうることができる。このアブシジン酸を添加した培地はインドール酪酸及びベンジルアデニンを含む培地に予め培養したものでもなくとも発根促進作用がある。インドール酪酸、ベンジルアデニンとアブシジン酸を一つの培地に加えてもよいが別々の培地とすることが望ましい。

〔作用〕

アリウム属の植物組織より誘導した多芽体又は莖葉をインドール酪酸とベンジルアデニンを含む培地に培養することによって莖葉の生育が促進され、アブシジン酸を含む培地に培養することによって発根が促進される。

- 7 -

〔実施例〕

実施例 1

ムラシゲとスクーグの無機塩培地にショ糖30g/l、ニコチン酸0.5 mg/l、イノシトール100 mg/l、チアミン塩酸0.1 mg/l、ピリドキサル塩酸0.5 mg/l、グリシン1 mg/l及び寒天10g/lを加え、pH5.8に調整したものを基本培地として常法により下記の培地を調整した。

培地 1	基本培地 + 2,4-D	2 mg/l
培地 2	基本培地 + ナフタレン酢酸	0.5 mg/l
	+ ベンジルアデニン	0.5 mg/l
培地 3	基本培地 + インドール酪酸	2 mg/l
	+ ベンジルアデニン	0.0 mg/l
培地 4	基本培地 + インドール酪酸	2 mg/l
	+ ベンジルアデニン	0.1 mg/l
培地 5	基本培地 + インドール酪酸	2 mg/l
	+ ベンジルアデニン	0.2 mg/l
培地 6	基本培地 + インドール酪酸	2 mg/l
	+ ベンジルアデニン	0.5 mg/l
培地 7	基本培地 + インドール酪酸	2 mg/l
	+ ベンジルアデニン	1.0 mg/l

- 9 -

- 8 -

ニンニクリン片の成長点および普通葉を無菌的に切り出し、培地 1 に置床して、25℃暗黒下で培養した。1~2ヵ月ほどでカルスが派生した。カルスを培地 2 へ移植し、25℃で16時間/日の光照射下で培養し、莖葉を分化させた。ほとんどのカルスは、複数の莖葉を分化し、多芽体を形成した。多芽体を莖葉 1 本ずつに分離し、培地 3~7 へ移植した。このとき、各莖葉の生重量を測定した。莖葉は、25℃、16時間/日の光照射下で培養した。培養 4 週間後、莖葉数の増加がみとめられた。また、生重量を測定した。結果を第 1 図に示す。

実施例 2

実施例 1 と同じ基本培地にアブシジン酸等を加えて常法により下記の培地 8~11 を作製した。

培地 8	基本培地 + アブシジン酸	0.01 mg/l
培地 9	基本培地 + アブシジン酸	0.1 mg/l
培地 10	基本培地 + アブシジン酸	1.0 mg/l
培地 11	基本培地 + ナフタレン酢酸	0.1 mg/l
	+ カイネチン	0.1 mg/l

- 10 -

実施例 1 でえられた茎葉を 1 本ずつに分離し、培地 8 ~ 11 に移植した。茎葉は、25℃、16 時間 / 日の光照射下にて培養した。4 週間後の移植した茎葉の茎葉増加と発根を調べた。下表に結果を示す。

培地 No	茎葉形成数	発根率 (%)
基本培地	±	53
培地 8	++	60
9	+++	93
10	++	70
11	+	60

実施例 3

ニンニクリン片の成長点および普通葉を無菌的に切り出し、培地 2 へ置床した。25℃、16 時間 / 日の光照射下で培養したところ 1 ~ 2 ヶ月ほどで茎葉が派生した。ほとんどの移植片は、複数の茎葉を分化し多芽体を形成した。多芽体を茎葉 1 本ずつに分離し、培地 6 ~ 11 に移植した。茎葉は、25℃、16 時間 / 日の光照射下で培養した。4 週間後、移植した茎葉の茎葉数増加と発根率を調べた。結果を下表に示す。

培地 No	茎葉形成数	発根率 (%)
基本培地	±	50
培地 8	++	63
9	+++	95
10	++	65
11	+	55

(発明の効果)

本発明の方法によりアリウム属の幼植物体、特にクローンやウィルスフリー株を容易に効率よく作製することができる。

4 図面の簡単な説明

第 1 図はインドール酪酸添加培地においてベンジルアデニンの濃度を変えて生重量の増加を測定した結果を示すグラフである。

特許出願人 味の素株式会社

代理人 弁理士 田中 政浩 ほか 1 名

- 1 1 -

- 1 2 -

第 1 図

